

بستگی طول موجی نرخ دارورسانی به سلولهای سرطانی پوست موش تحت اثرات حرارتی نانوذرات طلا در برهمکنش با لیزر نانوثانیه

سیده هاجر حسینی کیا- محمد رضاei پندری- آتوسا سادات عربانیان- ندا سلیمانی- رضا مسعودی*

(R-Massudi@sbu.ac.ir*) پژوهشکده لیزر و پلاسماء، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

چکیده - برهمکنش پالسهای کوتاه لیزری با نانوذرات فلزی موجب ایجاد گرمای شدیدی در اطراف نانوذره می شود که امروزه جهت درمان سرطان، دارورسانی سلولی و دیگر کاربردهای پزشکی استفاده می شود. در این مقاله فرایند دارورسانی سلول های سرطانی پوست موش تحت اثرات گرمایی ناشی از نانوذرات طلا در برهمکنش با لیزر نانوثانیه Nd:YAG با سه طول موج مختلف در محدوده فروسرخ، مری و فرابنفش مورد بررسی قرار می گیرد و نرخ دارورسانی و درصد زیست پذیری سلول ها برای این سه طول موج اندازه گیری می شود و در نهایت مشاهده می شود که به ازای یک انرژی مشخص، نرخ دارورسانی انجام شده در محدوده مرئی بیشتر از محدوده فرابنفش و فروسرخ خواهد بود.

کلید واژه- دارورسانی سلولی، لیزر پالسی نانوثانیه، نانوذرات طلا

Wavelength dependence of rate of drug delivery to murine melanoma under the thermal effects of gold nanoparticles interaction with nanosecond laser

Seyyede Hajar Hosseinkia- Mohammad Rezae Pandari- Atoosa Sadat Arabanian- Neda Soleimani- Reza Massudi*

Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran
(R-Massudi@sbu.ac.ir*)

Abstract- Interaction of the short-pulse lasers with metal nanoparticles leads to produce a large amount of heat around the nanoparticles. Today, it is used for cancer therapy, drug delivery and other medical applications. In this article, the process of drug delivery to murine melanoma under the thermal effects of gold nanoparticle interaction with three different wavelengths of Nd:YAG nanosecond laser in infrared, visible and ultraviolet regimes, is investigated and drug delivery rate and cell viability rate for these three different wavelengths is measured and finally, it is observed that for a specific amount of energy, the drug delivery rate in visible regime is more than that in ultraviolet and infrared regimes.

Keywords: Cell drug delivery, nanosecond-pulse laser, gold nanoparticles

تئوری

۱- برهمنکنش نور با نانوذرات فلزی

هنگامی که نانوذرات فلزی تحت تابش امواج الکترومغناطیسی با طول موج هایی بزرگتر از ابعاد نانوذره قرار می گیرند، الکترون های آزاد آنها تحت فرکانسی به نام فرکانس پلاسمای شروع به نوسان می کنند. نوسان این الکترون ها موجب تولید یک میدان الکترومغناطیسی قوی و میزان زیادی گرما در فاصله ای کمی از نانوذره می شود که اندازه ای این میدان و گرما مستقیماً به دو کمیت سطح مقطع پراش C_{sca} و سطح مقطع جذب C_{abs} مربوط می شود [۴].

$$C_{sca} = \frac{8\pi k^4 a}{3} \left| \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right|^2 \quad (1)$$

$$C_{abs} = 4\pi k a^3 \operatorname{Im} \left[\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right] \quad (2)$$

که (ϵ) = گذردهی الکتریکی نانوذرات، ϵ_m گذردهی الکتریکی محیط، (a) فرکانس نور فرودی، a شعاع نانوذرات و K تابعی از ضریب شکست نانوذره است. بنابراین اندازه ای گرما و میدان تولید شده به فرکانس نور فرودی بستگی دارد.

در اثر برهمنکنش نانوذرات فلزی با امواج الکترومغناطیسی درون محیط های مایع همچون محیط کشت سلول، بسته به میزان بزرگی میدان الکترومغناطیسی و گرمایی تولید شده، امکان تولید حباب هایی در ابعاد نانومتری وجود دارد که به دو دسته ای نانوحباب های پلاسمایی و نانوحباب های گرمایی تقسیم می شود. برای تولید نانوحباب های پلاسمایی، شدت میدان نزدیک ایجاد شده حدود W/cm^2 10^{13} و برای تولید نانوحباب های گرمایی، دمای آستانه ای ایجاد شده در فاصله بسیار کم از نانوذره حدود K $520-647$ می باشد. در اثر برهمنکنش لیزر نانوثانیه با نانوذرات طلا، شدت میدان نزدیک ایجاد شده در حدود W/cm^2 10^7 می باشد که برای تولید نانوحباب پلاسمایی کافی نمی باشد. اما میزان گرمایی ایجاد شده در حدی است که می تواند منجر به تولید نانوحباب گرمایی بشود [۱،۵].

مقدمه

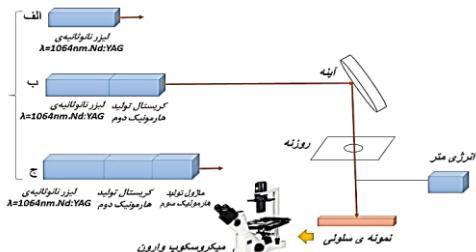
غشاء سلول های جانوری به عنوان یک لایه ای محافظه بین سیتوپلاسم و محیط خارج عمل می کند، بطوریکه تنها مولکول ها و یون های کوچک اجازه ای نفوذ به محیط درون سلول را دارند. بنابراین داروهایی با ابعاد مولکول های بزرگتر اجازه ای نفوذ به درون سلول را ندارند. از طرفی تولید داروهای جدید در ابعاد کوچک تر کاری بسیار پر هزینه می باشد. امروزه محققان به دنبال یافتن روش های نوینی جهت انتقال دارو به درون سلول می باشند. روش های زیستی، شیمیایی و فیزیکی همچون تزریق مستقیم، الکتروپریشن^۱ و ... هر یک با معایبی نظیر درصد پایین زیست پذیری (درصد پایین زنده ماندن سلول ها) یا نرخ پایین دارورسانی (درصد پایین سلول های دارورسانی شده) روبرو هستند. نتایج تجربی نشان می دهد که گرمایی ایجاد شده در اثر برهمنکنش پالس لیزری با نانوذرات طلا توانایی ذوب کردن لایه لیپیدی غشای سلولی و ایجاد روزنه روی آن را دارد [۱]. در سال ۲۰۰۳، برای اولین بار لین^۲ و همکارانش با استفاده از ذرات پلاسمونی بر روی افزایش نفوذ پذیری غشاء کار کردند و دو مشکل درصد پایین زیست پذیری و نرخ پایین دارورسانی را رفع کردند [۳]. تا سال ۲۰۱۳ تمامی تحقیقات با استفاده از طول موج ۵۳۲ nm انجام می گرفت تا این که در سال ۲۰۱۳ ۵۳۲ nm و ۱۰۶۴ nm همکارانش اثر طول موج ۵۳۲ nm و ۱۰۶۴ nm لیزر نانوثانیه Nd:YAG و نانوذرات طلا را جهت انجام فرایند دارورسانی سلولی بررسی کردند و به مقایسه ای اثر این دو طول موج بر روی نتیجه های آزمایشات مربوط به دارورسانی سلولی پرداختند [۱]. به دلیل وابستگی نرخ دارورسانی به طول موج لیزر، در این مقاله به بررسی و مقایسه ای اثر برهمنکنش سه طول موج ۱۰۶۴ nm، ۵۳۲ nm و ۳۵۵ nm لیزر نانوثانیه Nd:YAG و نانوذرات طلا جهت انجام فرایند دارورسانی به سلول سلطانی پوست موش خواهیم پرداخت.

1-Electroporation

2-Lin

3-Meunier

چیدمان تجربی دارو رسانی سلولی توسط برهmeknesh لیزر با نانوذرات طلا برای سه طول موج (الف) ۱۰۶۴nm، (ب) ۵۳۲nm و (ج) ۳۵۵nm در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: چیدمان تجربی دارو رسانی سلولی توسط برهmeknesh لیزر و نانوذرات طلا در طول موج (الف) ۱۰۶۴ nm، (ب) ۵۳۲ nm، (ج) ۳۵۵ nm

در این چیدمان، از یک لیزر Nd:YAG با طول پالس ۱۰ ns و نرخ تکرار ۱۰ Hz استفاده شده است. در هر سه آزمایش، باریکه‌ی لیزر پس از برخورد به یک آینه با ضریب بازتاب بالا و عبور از یک روزنه که قطر آن به اندازه‌ی قطر هر چاهک حاوی سلول است، به نمونه‌ی سلولی حاوی نانوذرات طلا برخورد می‌کند. انرژی پالس خروجی از روزنه توسط انرژی‌متر اندازه‌گیری می‌شود. جهت بررسی نرخ دارو رسانی انجام شده، رنگ را قبل از پرتودهی سلول‌ها، به محیط کشت اضافه می‌کنیم. در اثر برهmeknesh لیزر با نانوذرات طلا انتظار می‌رود بر روی غشاء سلول‌ها روزنه ایجاد شود و رنگ به عنوان دارو وارد سلول شود. سپس با استفاده از یک میکروسکوپ وارون تعداد سلول‌های رنگ شده (آبی) و رنگ نشده بررسی می‌شود. به این ترتیب سلول‌هایی که روی غشاء آن‌ها روزنه ایجاد شده و رنگ وارد آن‌ها شده یا به عبارتی دارو رسانی شده است از سلول‌های بی‌رنگ دارو رسانی نشده متمایز می‌گردد. برای بررسی میزان درصد زیست‌پذیری، ابتدا سلول‌ها تحت تابش لیزر قرار داده می‌شود و پس از گذشت دو ساعت و بسته شدن غشاء سلول‌ها، رنگ را به محیط کشت اضافه می‌کنیم و سلول‌ها را توسط میکروسکوپ بررسی می‌کنیم. به این ترتیب، سلول‌های رنگ شده نمایشگر سلول‌هایی هستند که غشاء آن‌ها پس از باز شدن، بسته نشده است، بنابراین سلول مرده محسوب می‌شوند. سلول‌های رنگ نشده نیز نمایشگر سلول‌های زنده می‌باشد. درصد زیست‌پذیری و نرخ دارو رسانی با استفاده از روابط زیر محاسبه می‌شود:

۲- غشاء سلول و ایجاد روزنه بر روی آن

جهت وارد کردن داروهایی با ابعاد بزرگ به درون سلول، باید روی غشاء آن روزنه ایجاد کنیم. نتایج تجربی نشان می‌دهد که گرمای ناشی از نانوحباب‌های ایجاد شده در اثر برهmeknesh پالس لیزری با نانوذرات طلا توانایی ذوب کردن لایه لیپیدی غشای سلول و ایجاد روزنه روی آن را دارد و می‌تواند اجازه‌ی ورود مولکول‌های بزرگ‌تر اعم از انواع داروها را بدهد و ایده‌ی مناسبی جهت دارو رسانی سلولی باشد به طوری که در نهایت میزان زیست‌پذیری سلولها و نرخ دارو رسانی نتیجه‌ی مناسب‌تری را نسبت به روش‌های پیشین فراهم می‌کند [۱].

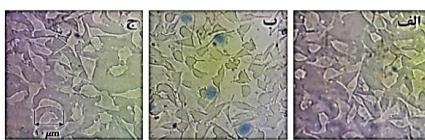
چیدمان تجربی

آماده سازی نمونه:

نانوذرات طلا به روش سنتز شیمیابی تهیه شده است که اندازه‌ی اکثر آن‌ها در بازه‌ی ۵۰-۶۰ nm می‌باشد. آزمایشات صورت گرفته در بخش بعد نیز، برای سه غلظت ۸، ۱۶ و ۲۴ µg/ml انجام گرفته است که برای غلظت ۸ µg/ml دارو رسانی سلولی انجام نمی‌پذیرد و در غلظت ۲۴ µg/ml نیز تمامی سلول‌ها دچار مرگ سلولی می‌شوند. اما برای غلظت ۱۶ µg/ml درصد زیست‌پذیری سلول‌ها و نرخ دارو رسانی در حالت بهینه می‌باشد. بنابر این تمامی آزمایش‌ها با نانوذرات با غلظت ۱۶ µg/ml انجام می‌شود. چهار ساعت قبل از انجام آزمایش، سلول‌های سلطانی پوست موش کشت داده می‌شود و سپس تعداد ۵۰۰۰ سلول داخل چاهک‌های مورد مطالعه ریخته می‌شود. سپس سلول‌ها میان نانوذرات طلا با غلظت ۱۶ µg/ml خوابانده می‌شود. برای بررسی میزان دارو رسانی صورت گرفته به جای دارو از رنگ تریپان‌بلو استفاده می‌شود تا سازوکار باز و بسته شدن غشاء توسط ورود رنگ به درون سیتوپلاسم بررسی شود. بررسی درصد زیست‌پذیری سلول‌ها و بسته شدن غشاء نیز، توسط اضافه کردن رنگ تریپان‌بلو به محیط کشت سلول، پس از گذشت ۲ ساعت صورت می‌گیرد [۲].

چیدمان اپتیکی:

نانوذرات طلا برای سه طول موج (الف) ۱۰۶۴ nm، (ب) ۵۳۲ nm و (ج) ۳۵۵ nm را نشان می‌دهد. بزرگ نمایی میکروسکوپ نوری نیز، X ۲۰۰ می‌باشد. طبق شکل ۳-ب، در اثر برهمکنش طول موج ۵۳۲ nm لیزر با نانوذرات طلا، واکنش‌های لازم جهت تولید گرما و ایجاد روزنه بر روی غشاء رخ داده است و رنگ تریپان بلو وارد محیط سیتوپلاسم شده است. در حالی که به ازای طول موج های ۳۵۵ nm و ۱۰۶۴ nm میزان گرمای لازم جهت ایجاد روزنه بر روی غشاء تولید نشده است و رنگ وارد محیط سیتوپلاسم نشده است و سلول‌ها بی‌رنگ مانده‌اند.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی سلول‌های مورد مطالعه پس از برهمکنش لیزر و نانوذرات طلا برای سه طول موج (الف) ۱۰۶۴ nm، (ب) ۵۳۲ nm و (ج) ۳۵۵ nm

نتیجه‌گیری

سطح مقطع جذب بالای نانوذرات طلا در طول موج ۵۳۲ nm نسبت به طول موج‌های ۳۵۵ nm و ۱۰۶۴ nm باعث تولید مقدار زیادی گرما در انرژی‌های نسبتاً پایین شده، که سبب ذوب شدن غشاء و ایجاد روزنه بر روی آن می‌شود. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که با استفاده از هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG می‌توان در انرژی‌های پایین، نرخ بالایی از دارو رسانی و زیست پذیری برای سلول‌های زیستی را بدست آورد.

مرجع‌ها

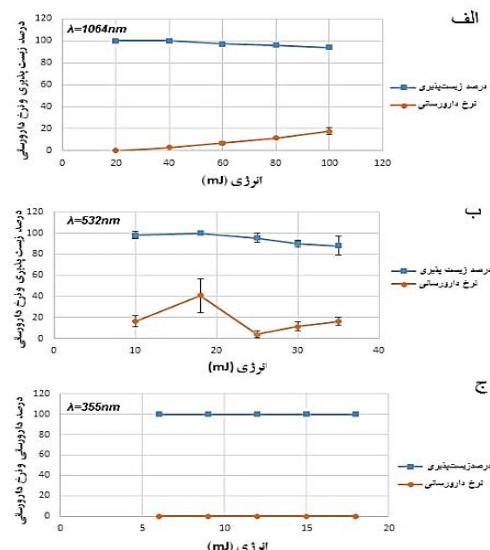
- [1] Lalonde, B. S.-L.; Boulais, É.; Lebrun, J.-J.; Meunier, M. Visible and Near Infrared Resonance Plasmonic Enhanced Nanosecond Laser Optoporation of Cancer Cells. *Biomed. Opt. Express* 2013, 4, 490–499
- [2] Cell perforation mediated by plasmonic bubbles generated by a single near infrared femtosecond laser pulse
- [3] Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, Anderson RR, Lin CP (2003) Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J* 84:4023–4032
- [4] Stefan A. Maier, Plasmonics:Fundamentals and applications
- [5] Pustovalov VK, Smetannikov AS, Zharov VP. Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses. *Laser Phys Lett* 2008;5(11):775–92

$$\text{درصد زیست پذیری} = \frac{\text{سلول‌های بدون رنگ}}{\text{کل سلول‌ها}} \times 100\%$$

$$\text{نرخ دارو رسانی} = \frac{\text{سلول‌های رنگ شده}}{\text{کل سلول‌ها}} \times (\text{درصد زیست پذیری})$$

نتایج تجربی

نرخ دارو رسانی سلولی و درصد زیست‌پذیری پس از گذشت دو ساعت برای سه آزمایش جداگانه در طول موج‌های ۱۰۶۴ nm، ۵۳۲ nm و ۳۵۵ nm لیزر نانوثانیه‌ی Nd:YAG به ازای تابش ۹۰ پالس برای هر چاهک حاوی سلول، محاسبه و در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: نرخ دارو رسانی (نقاط دایره) و درصد زیست پذیری (نقاط مربع) سلول‌های B16 برای سه طول موج (الف) ۱۰۶۴ nm، (ب) ۵۳۲ nm، (ج) ۳۵۵ nm به ازای انرژی‌های مختلف پالس (هر آزمایش سه بار تکرار شده است)

با محاسبه سطح مقطع های جذب توسط رابطه‌ی ۲، سطح مقطع جذب در طول موج ۵۳۲ nm بیست برابر سطح مقطع جذب در طول موج ۱۰۶۴ nm و دو برابر سطح مقطع جذب در طول موج ۳۵۵ nm می‌باشد که باعث می‌شود نانوذرات طلا در این طول موج گرمای بیشتری تولید کند و منجر به ذوب غشاء و ایجاد روزنه بر روی آن بشود. طبق نمودارهای شکل ۲، نرخ دارو رسانی سلولی در انرژی ۱۸ mJ برای طول موج ۵۳۲ nm بیشترین میزان خود را دارد که نشان دهنده‌ی تولید گرمای بیشتر توسط نانوذرات می‌باشد. در حالی که به ازای این انرژی در دو طول موج دیگر دارو رسانی انجام نشده است. شکل ۳ تصویر میکروسکوپی سلول‌های مورد مطالعه پس از برهمکنش لیزر و